



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(19)

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 004 940
A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 79101113.3

(51) Int. Cl.²: **G 01 N 33/16**

(22) Anmeldetag: 11.04.79

C 07 G 7/00, G 21 H 5/00

(30) Priorität: 18.04.78 DE 2816841

(71) Anmelder: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V.

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
31.10.79 Patentblatt 79 22

Bunsenstrasse 10
D-3400 Göttingen(DE)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE FR GB IT LU NL SE

(72) Erfinder: Timpl, Rupert, Dr.
Bergstrasse 18
D-8033 Krailling(DE)

(74) Vertreter: Weickmann, Heinrich, Dipl.-Ing. et al,
Postfach 860 820 Möhlstrasse 22
D-8000 München 86(DE)

(54) Verfahren zur radioimmunologischen Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III), zur Herstellung von für das Verfahren geeignetem Prokollagen-Peptid (Typ III) und zur Herstellung von Anti-Prokollagen-Peptid (Typ III)-Serum.

(57) Zur radioimmunologischen Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III) werden eine bestimmte Menge radioaktiv markiertes Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) und ein hochspezifisches Anti-Prokollagen- (Typ III) -Serum bzw. Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serum gemeinsam mit einer Probe mit unbekanntem Gehalt an Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) zur Reaktion gebracht, der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird abgetrennt, zweckmäßig durch Zusatz eines gegen das hochspezifische Antiserum gerichteten zweiten Antikörpers, und die Radioaktivität des Komplexes oder des Überstandes gemessen. Hierfür geeignetes hochgereinigtes Prokollagen-Peptid (Typ III) erhält man durch Abbau von Gewebe oder Körperflüssigkeiten mit Kollagenase und Reinigung durch Immunadsorption und Chromatographie.

EP 0 004 940 A1

BEZEICHNUNG GEÄNDERT
siehe Titelseite

- 1 -

Radioimmunologische Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III).

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur radioimmuno-
logischen Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Pro-
kollagen-Peptid (Typ III) und die Herstellung eines für
dieses Verfahren geeigneten Prokollagen-Peptids (Typ
III).
5

Prokollagen (Typ III) ist eine biosynthetische Vorläu-
ferform eines speziellen Kollagens (Typ III), das
hauptsächlich im retikulären Bindegewebe vorkommt. Es
unterscheidet sich von Kollagen (Typ III) durch ein zu-
sätzliches, am Aminoende lokalisiertes Peptidsegment
10 (Prokollagen-Peptid (Typ III)), das sich durch Behand-
lung mit Kollagenase vom Molekül abspalten lässt.

15 Neuere Immunofluoreszenz-Untersuchungen haben gezeigt,
daß fibrosierende Prozesse, die z. B. bei Leberzirrho-
se und Hepatitis auftreten, von einem hohen Umsatz von
Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III)
begleitet sind. Der Nachweis dieser im Blut zirkulie-
renden Antigene erlaubt deshalb eine frühzeitige Erken-
nung derartiger Erkrankungen.
20

Immunhistologische Untersuchungen gestatten zwar einen
spezifischen Nachweis dieser Antigene, lassen sich aber

nicht quantitativ auswerten. Dadurch ist die Aussagekraft derartiger Methoden begrenzt.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, dieses
5 Problem zu lösen und ein quantitatives, rasch und einfache durchzuführendes Verfahren zur Bestimmung dieser Antigene zu schaffen.

Es wurde nun gefunden, daß eine quantitative Messung
10 derartiger Antigene durch eine radioimmunologische Bestimmungsmethode möglich ist.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren
zur radioimmunologischen Bestimmung von Prokollagen
15 (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III), bei dem
eine bestimmte Menge radioaktiv markiertes Prokollagen
(Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) und ein
hochspezifisches Anti-Prokollagen-(Typ III)-Serum oder
ein Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serum gemeinsam
20 mit einer Probe mit unbekanntem Gehalt an Prokollagen
(Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) zur Reaktion
gebracht werden. In der vom Radio-Immuno-Assay (RIA)
an sich bekannten Weise konkurriert hierbei das radio-
aktiv markierte Prokollagen bzw. Prokollagen-Peptid
25 mit dem in der zu bestimmenden Probe enthaltenen, nicht-
markierten Prokollagen oder Prokollagen-Peptid um den
Antikörper, so daß im gebildeten Antigen-Antikörper-
Komplex die Radioaktivität um so geringer ist, je mehr
nichtmarkiertes Prokollagen bzw. Prokollagen-Peptid in
30 der zu bestimmenden Probe enthalten ist. Der gebildete
unlösliche Antigen-Antikörper-Komplex kann in üblicher
Weise aus der Lösung abgetrennt und die darin enthalte-
ne Radioaktivität bestimmt werden. Alternativ ist es
auch möglich, die in der Lösung, also im Überstand der
35 Abtrennung des Antigen-Antikörper-Komplexes, verblei-

bende Radioaktivität zu messen. Anhand einer Eichkurve, die mittels Proben von bekanntem Gehalt an Prokollagen oder Prokollagen-Peptid erstellt wurde, läßt sich dann die in der zu untersuchenden Probe enthaltene Menge Prokollagen oder Prokollagen-Peptid feststellen.

Die Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes von der Lösung kann nach den hierfür dem Fachmann bekannten, üblichen Methoden erfolgen, wie Abfiltrieren, Absaugen, 10 Abzentrifugieren und dergleichen. Auch ist es möglich, das Antiserum an einen festen Träger, beispielsweise die Innenwand eines Reagenzglases gebunden, anzuwenden.

Vorzugsweise wird das Verfahren so durchgeführt, daß die 15 Trennung des mit dem hochspezifischen Anti-Prokollagen-(Typ III)-Serum oder mit dem Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serum gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexes von dem nichtumgesetzten Antigen durch die Verwendung eines gegen das hochspezifische Serum gerichteten zweiten 20 Antikörpers erfolgt. Bevorzugt wird hierfür ein Antikörper gegen γ -Immunooglobulin der für die Gewinnung des Antiserums verwendeten Tierart.

Die Markierung des Antigens, d. h. des Prokollagens 25 (Typ III) oder Prokollagen-Peptids (Typ III) mit dem Radionuclid, kann mit den für die Radiomarkierung von Proteinen bekannten Methoden durchgeführt werden. Als Radionuclid wird vorzugsweise Jod 125 verwendet. Zur Markierung mit diesem Radionuclid wird die Chloramin-T-Methode (Int. Arch. Allergy, 29 185) bevorzugt.

Für die erfindungsgemäße Bestimmungsmethode ist es entscheidend, daß eine geeignete Quelle zur Gewinnung von 35 Prokollagen-Peptid (Typ III) zur Verfügung steht. Es hat sich nun gezeigt, daß die Herstellung von humanem

oder tierischem, hochgereinigtem Prokollagen-Peptid (Typ III) aus Tiergewebe oder pathologischen Körperflüssigkeiten möglich ist, wenn das Gewebe mit Kollagenase abgebaut und das Prokollagen oder Prokollagen-Peptid aus dem Kollagenase-Extrakt oder der Körperflüssigkeit abgetrennt und durch Kombination von chromatographischen Methoden und/oder Immunadsorption gereinigt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung eines für das erfindungsgemäße Bestimmungsverfahren geeigneten hochgereinigten Prokollagen-Peptids (Typ III), welches dadurch gekennzeichnet ist, daß humanes oder tierisches Gewebe oder pathologische Körperflüssigkeit oder Kollagen-Extrakte derselben mit Kollagenase abgebaut und das dabei gebildete Prokollagen oder Prokollagen-Peptid aus dem Kollagenase-Extrakt oder der Körperflüssigkeit abgetrennt und chromatographisch oder durch Immunadsorption oder durch Kombination dieser Methoden gereinigt wird.

Als Tiergewebe haben sich fetale Kälberhaut und als Körperflüssigkeit humane Ascites-Flüssigkeit besonders ergiebig zur Gewinnung des Prokollagen-Peptids (Typ III) erwiesen.

Die Reinigung mittels Immunadsorption wird zweckmäßig wie folgt durchgeführt: In einem ersten Schritt werden gereinigte Antikörper gegen Prokollagen-Peptid (Typ III) unlöslich gemacht. Die Reinigung der verwendeten Antikörper erfolgt zweckmäßig über Affinitätschromatographie, es können jedoch auch die anderen für die Antikörperreinigung an sich bekannten Methoden angewendet werden. Bevorzugt werden aus Kaninchen gewonnene Antikörper verwendet. Die Unlöslichmachung erfolgt durch Fixierung an einen festen Träger nach den bekannten Me-

- thoden der Fixierung biologisch aktiver Proteine an fe-
ste Träger. Bevorzugt erfolgt die Bindung an mit Brom-
cyan aktivierte Agarose oder diazotierte p-Aminobenzyl-
cellulose. Mit dem so hergestellten Antikörperadsorbens
5 werden die gegebenenfalls vorgereinigten Extrakte bzw.
Körperflüssigkeiten dann inkubiert. Das Prokollagen-
Peptid (Typ III) bindet hierbei an das Antikörperadsor-
bens und wird dann, zweckmäßigerweise nach Waschen des
Trägers, mit geeigneten Elutionsmitteln wieder eluiert.
10 Geeignete Elutionsmittel lassen sich durch einfache Vor-
versuche leicht ermitteln. Besonders geeignet erwies
sich etwa 3 molare KSCN-Lösung für die Elution, jedoch
lassen sich selbstverständlich auch andere Salzlösungen
verwenden.
- 15 Das so hergestellte gereinigte Prokollagen-Peptid (Typ
III) wird dann zur Immunisierung verwendet und so nach
den üblichen Methoden der Antiserumgewinnung ein hoch-
spezifisches Anti-Prokollagen-Peptid- (Typ III)-Serum her-
gestellt. Zweckmäßigerweise erfolgt die Immunisierung
20 durch subkutane Injektion von Prokollagen-Peptid (Typ
III) in Versuchstiere, vorzugsweise Kaninchen, in Ge-
genwart des kompletten Freund'schen Adjuvans. In diesem
bevorzugten Fall beträgt die Antigendosis dabei zweck-
mäßigerweise etwa 2 mg/Tier.
25
- Der erfindungsgemäße Radio-Immun-Test erlaubt die Mes-
sung von Konzentrationen bis in den Bereich von 1 ng/ml.
Damit ist es möglich, den Test zur Feststellung von An-
tigen in Humanseren einzusetzen. Ein Vergleich von Pro-
banden mit Leberfibrose zeigte einen bis zu zehnfachen
30 Anstieg in der Konzentration des Antigens, wodurch Le-
bererkrankungen sicher festgestellt werden können.
- 35 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

B e i s p i e l 1

Durchführung des Radio-Immun-Tests:

- 5 25 µg Prokollagen-Peptid (Typ III) werden mit 1 Milli-Curie Jod 125 nach der Chloramin-T-Methode markiert und ungebundenes Jod durch Dialyse entfernt. Die weiteren Schritte bei der Herstellung des Radio-Immun-Tests werden vorzugsweise in Gegenwart von 0,04 % eines nichtionischen Detergents, wie z. B. Tween 20, durchgeführt. Bindungskurven mit Antikörpern werden mit 2 ng markiertem Peptid bestimmt. Die Konzentration an Prokollagen-Peptid (Typ III) in einer unbekannten Probe von Serum oder anderen Körperflüssigkeiten wird in folgendem Inhibitionstest bestimmt:
10 Eine bestimmte Menge des Antikörpers wird mit der unbekannten Probe 6 Stunden bei 4°C vorinkubiert und nach Zugabe von 2 ng markiertem Peptid weitere 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wird ein Überschuß von Antikörper
15 gegen Kaninchen-γ-Immunglobulin zugesetzt und das im Immunkomplex gebundene Antigen aus der Lösung abgetrennt. Die Inhibitionsaktivität der unbekannten Probe wird mit der Aktivität einer Standard-Konzentration von nichtmarkiertem Prokollagen-Peptid (Typ III) verglichen.

25

B e i s p i e l 2

Herstellung von Prokollagen-Peptid (Typ III):

- 30 Prokollagen-Peptid (Typ III) wird hergestellt durch Einwirkung von Kollagenase auf Prokollagen (Typ III) bei 37°C. Hierbei wird das Peptid keinen Denaturierungsmitteln ausgesetzt. Zur Herstellung größerer Mengen des Peptids wird ein modifiziertes Verfahren angewendet.
35 Alle Verfahrensschritte bis zur Einwirkung der Kollage-

nase werden im Kälterraum durchgeführt. Die verschiedenen NaCl-Lösungen, die zur Löslichmachung eingesetzt werden, enthalten 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,01 M ÄDTA, Natriumazid (200 mg/ml) und die Proteasen-Inhibitoren 5 Phenylmethylsulfonylfluorid (3₁ug/ml) und p-Chlormercurobenzoat (3₁ug/ml).

Fetale Kälberhaut (3 kg) wird in 10 l 1 M NaCl homogenisiert und zwei Tage lang extrahiert. Gelöstes Kollagen wird aus dem Extrakt gefällt durch Zugabe von festem NaCl bis zu einer Endkonzentration von 2,5 M. Nach Rühren über Nacht wird das Präzipitat durch Zentrifugierung gesammelt (1800 xg, 20 Minuten), zweimal mit 2,5 M NaCl gewaschen und wieder aufgelöst, indem es über Nacht 15 in 10 l 0,5 M NaCl gerührt wird. Kleine Mengen unlöslichen Materials werden durch Zentrifugierung entfernt. Die so erhaltene Mischung von Kollagen (Typ III) und Prokollagen (Typ III) wird dann mit 1,6 M NaCl gefällt. Das Präzipitat wird dann in 2 l 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0) 20 suspendiert und nach Zusatz von 0,02 M CaCl₂ 20 Minuten lang bei 50°C erhitzt und anschließend 3 Stunden bei 37°C zusammen mit 1500 Einheiten bakterieller Kollagenase pro Gramm feuchtes Präzipitat inkubiert. Nach Einwirkung der Kollagenase wird das gebildete Präzipitat 25 durch Zentrifugierung abgetrennt und die Lösung dialysiert gegen 0,005 M Tris-HCl, pH 8,6, 8 M Harnstoff und über die DEAE-Cellulosesäule (5,0 x 30 cm) gegeben, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert wurde.

30 Die auf der Säule gebundenen Proteine werden mit NaCl-Lösungen ausgewaschen, deren Konzentration von 0 bis 0,3 M ansteigt. Die gesamte Elutionsmenge beträgt 2 l. Die aus der Säule ausfließende Lösung wird bezüglich der Adsorption bei 236 nm und ihrer Antigenaktivität 35 durch Verwendung von Antikörpern überprüft, die spezi-

fisch für das amino-terminale Segment des Prokollagens (Typ III) sind. Normalerweise enthält der letzte Peak, der aus der Säule eluiert wird, das Prokollagen-Peptid (Typ III). Das Peptid wird durch Dialyse gegen destilliertes Wasser entsalzt und lyophilisiert. Die weitere Reinigung erfolgt auf einer Säule mit Agarose A 1,5 M (2 x 120 cm), die mit 1 M CaCl_2 , 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, äquilibriert ist.

- 1 -

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur radioimmunologischen Bestimmung von Prokollagen (Typ III) und Prokollagen-Peptid (Typ III), dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß eine bestimmte Menge radioaktiv markiertes Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) und ein hochspezifisches Anti-Prokollagen-(Typ III)-Serum bzw. Anti-Prokollagen-Peptid-(Typ III)-Serum gemeinsam mit einer Probe mit unbekanntem Gehalt an Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) zur Reaktion gebracht werden, der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex abgetrennt und die Radioaktivität des Komplexes oder des Überstandes gemessen wird.
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß ein mit einem Radionuclid markiertes Prokollagen (Typ III) oder Prokollagen-Peptid (Typ III) verwendet wird.
15
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch g e k e n n - z e i c h n e t , daß als Radionuclid Jod 125 verwendet wird.
20
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch g e k e n n z e i c h n e t , daß der aus Anti-

Prokollagen- (Typ III)-Serum bzw. Anti-Prokollagen-Peptid- (Typ III)-Serum und Prokollagen (Typ III) bzw. Prokollagen-Peptid (Typ III) gebildete Antigen-Antikörper-Komplex von nichtumgesetztem Antigen durch Zusatz eines gegen das hochspezifische Antiserum gerichteten zweiten Antikörpers und Abtrennung des damit gebildeten Komplexes vom Überstand, abgetrennt wird.

5. Verfahren zur Herstellung von für das Verfahren
1c von Anspruch 1 bis 4 geeignetem hochgereinigtem Prokollagen-Peptid (Typ III), dadurch g e k e n n z e i c h -
n e t , daß humanes oder tierisches Gewebe oder patho-
logische Körperflüssigkeiten bzw. Kollagenextrakte da-
von mit Kollagenase abgebaut und das dabei gebildete
15 Prokollagen oder Prokollagen-Peptid abgetrennt und durch
Kombination von chromatographischen Methoden und/oder
Immunadsorption gereinigt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch g e k e n n -
2c z e i c h n e t , daß als Tiergewebe fetale Kälberhaut
bzw. als Körperflüssigkeit humane Ascitesflüssigkeit
eingesetzt wird.

7. Verfahren zur Herstellung eines hochspezifischen
25 Anti-Prokollagen-Peptid- (Typ III)-Serums, dadurch
g e k e n n z e i c h n e t , daß ein nach Anspruch 5
oder 6 hergestelltes Prokollagen-Peptid (Typ III) zur
Immunisierung von Versuchstieren verwendet und deren
Serum gewonnen wird.

30



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0004940

Nummer der Anmeldung

EP 79 101 113.3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.)
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.)
A	DE - A - 1 598 945 (PHARMACIA) * ganzes Dokument * --		G 01 N 33/16 C 07 G 7/00 G 21 H 5/00
A	ANGEWANDTE CHEMIE, 88. Jahrgang, Nr. 17, 1976, Weinheim H.G. ECKERT, "Die Technik des Radioimmunoassays" Seiten 565 bis 573 --		
A	MEDIZINAL-MARKT/ACTA MEDICOTECHNICA, 25. Jahrgang, Nr. 10, 1977, Berlin H.MEINHOLD, "Nuklearmedizinische in-vitro-Diagnostik im Submikrobereich" Seiten 317 bis 322 --		C 07 G 7/00 G 01 N 33/16 G 21 H 5/00
A, D	INTERNATIONAL ARCHIVES OF ALLERGY, Band 29, 1966, Basel P.J. McCONAHEY et al. "A Method of Trace Iodination of Proteins for Immunologic Studies" Seiten 185 bis 189 -----		
<input checked="" type="checkbox"/> Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.		KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE	
		X: von besonderer Bedeutung A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
<input checked="" type="checkbox"/>			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prufer	
Berlin	16-07-1979	SCHWARTZ	